

氏 名	瓜生 央大
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第4972号
学位授与の日付	平成26年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular analysis of the circadian clock system in the cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i> (フタホシコオロギ概日時計機構の分子生物学的研究)
論文審査委員	教授 富岡 憲治 教授 上田 均 准教授 中越 英樹

### 学位論文内容の要旨

フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) は, 幼虫期には昼行性を示すが, 羽化後約1週間で夜行性に移行する。しかし, そのリズムを駆動する概日時計の実体は明らかにされていない。そこで本研究では, 概日時計の分子振動機構を明らかにすること, また夜行性への移行に伴う時計の変化を中枢と末梢とで明らかにすることを目指して, まず1) 昆虫時計遺伝子の機能解析に用いる RNAi 効果の体系的検討を行い, 次いで2) 時計遺伝子 *cycle* (*cyc*) のクローニングと機能解析, 3) 末梢組織の概日時計の性質の検討, そして4) 夜行性への移行に伴う中枢および末梢時計の変化の解析を行った。

まず, フタホシコオロギおよびマダラシミを用いて, dsRNA の投与濃度と投与後の標的時計遺伝子のノックダウンの割合および継続期間について解析を行い, RNAi の効果が dsRNA 濃度依存的に, 投与後1~2週間持続することを明らかにした。

次に, フタホシコオロギ時計遺伝子 *cyc* をクローニングし, その機能解析を行った。その結果, *cyc* は転写活性化領域を持ち周期的に発現すること, その dsRNA 投与により, 活動リズムの周期が正常個体と比較して1時間以上も延長するとともに, 時計遺伝子 *period* (*per*), *timeless* (*tim*) の発現レベルが低下することが明らかとなった。これらの結果から, *cyc* が他の時計遺伝子の転写因子として時計振動機構に関わることが示唆された。また, *cyc* RNAi では通常一定の発現を示す時計遺伝子 *Clock* (*Clk*) が恒暗条件下で振動することが明らかとなった。

次いで, 成虫の視葉外組織における概日リズムの有無を調べるために, *per*, *tim* の日周変動を解析した。その結果, 脳, 腹部最終神経節, 前胃, 中腸などで視葉と同様の位相をもつ mRNA 発現リズムが明暗および恒暗条件下で確認された。視葉切除後では, 組織により, リズムの継続の有無に違いがあった。また脳ではリズムは継続したが位相前進が生ずること, 前胃では *per* が発現リズムを継続するのにに対して *tim* の発現は無周期となることなどが明らかとなった。これらの結果から, コオロギ成虫では視葉外組織も時計をもつが, その振動機構は中枢時計とは異なる特徴を持つこと, また視葉外時計への視葉時計からの制御は組織ごとに異なることが示唆された。

さらに, リズム逆転と末梢時計との関係を検討するために, 時計遺伝子発現リズムを指標として個体発生に伴う末梢時計の変化を解析した。その結果, 脳, 腹部最終神経節, 中腸などの時計遺伝子発現リズムの位相は幼虫と成虫とで同位相であること, また幼虫の各時計遺伝子の発現レベルが成虫に比べ有意に低いことを見出した。中枢時計の所在である視葉の切除後も成虫では末梢組織のリズムは継続したが, 幼虫ではそれらのリズムは消失した。すなわち, 幼虫の末梢時計は成虫のそれと比較して振動が弱く, かつ自律性も弱いことが明らかになった。

以上の結果から, フタホシコオロギ概日時計分子振動機構は, *cyc* と *Clk* の両者が潜在的に振動する機構を含む点で他種の昆虫と異なる特徴をもつこと, また末梢時計と中枢時計とでその振動機構が異なること, 羽化後のリズム逆転に伴い末梢時計の自律性が強化されることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*)の概日リズムを駆動する概日時計の実体と、昼行性から夜行性への移行に伴う時計の変化とを、中枢と末梢とで明らかにすることを目的とした。

まず、二本鎖 RNA(dsRNA)の投与濃度と投与後の標的時計遺伝子のノックダウンの割合および継続期間について解析を行い、RNAi の効果が dsRNA 濃度依存的に、投与後 1〜2 週間持続することを明らかにした。次に、時計遺伝子 *cycle* (*cyc*)をクローニングし、その機能解析を行い、*cyc* が転写活性化領域を含み日周期的に発現すること、その dsRNA 投与により、活動リズムの周期が正常個体と比較して 1 時間以上も延長するとともに、時計遺伝子 *period* (*per*), *timeless* (*tim*) の発現レベルが低下することを明らかにした。これらの結果から、*cyc* が他の時計遺伝子の転写因子として時計振動機構に関わることが示唆された。また、*cyc* RNAi では通常一定の発現を示す時計遺伝子 *Clock* (*Clk*)が恒暗条件下で振動することを明らかにした。次いで、成虫の中枢時計である視葉以外の組織における概日リズムの有無を調べるために、*per*, *tim* の日周変動を解析し、脳、腹部最終神経節、前胃、中腸などが視葉と同様の位相をもつ mRNA 発現リズムを示すことを明らかにした。視葉切除後では、組織によりリズムの継続の有無に違いがあること、脳ではリズムは継続したが位相前進が生ずること、前胃では *per* が発現リズムを継続するのに対して *tim* の発現は無周期となることなどを明らかにした。これらの結果から、視葉外組織も時計をもつが、その振動機構は中枢時計とは異なる特徴を持つこと、また視葉外時計への視葉時計からの制御は組織ごとに異なることが示唆された。さらに、リズム逆転と末梢時計との関係を検討するために、時計遺伝子発現リズムを指標として個体発生に伴う末梢時計の変化を解析し、脳、腹部最終神経節、中腸などの時計遺伝子発現リズムの位相が幼虫と成虫とで同位相であること、また幼虫では各時計遺伝子の発現レベルが成虫に比べ有意に低いこと、また幼虫では視葉の切除によりそれらのリズムが消失することを明らかにした。これらの結果から、幼虫の末梢時計は成虫のそれと比較して振動が弱く、かつ自律性も弱いことが示唆された。

以上の結果に基づき、フタホシコオロギ概日時計分子振動機構は、*cyc*と*Clk*の両者が潜在的に振動する機構を含む点で他種の昆虫と異なる特徴をもつこと、また末梢時計と中枢時計とでその振動機構が異なること、リズムが逆転する羽化後には末梢時計の自律性が強化されていることを示した。

本論文は昆虫概日時計振動機構の理解に大きく寄与するものであり、また、発表会での質疑に対する応答も充分であった。以上により、博士の学位に値すると判断された。